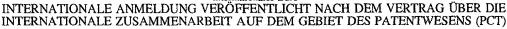
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷: C09B 23/02, 23/10, G01N 33/58

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53678

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

14. September 2000 (14.09.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE00/00802

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

9. März 2000 (09.03.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 11 421.8

11. März 1999 (11.03.99)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DY-OMICS [DE/DE]; Botzstrasse 5, D-07743 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CZERNEY, Peter [DE/DE]; Bodelschwinghstrasse 137, D-99425 Weimar (DE). LEHMANN, Frank [DE/DE]; Friedrich-Ebert-Strasse 28, D-93051 Regensburg (DE).
- (74) Anwalt: OEHMKE, Volker, Am Schwemmtümpfel 14, D-99441 Magdala (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: DE, US.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: LASER-COMPATIBLE NIR-MARKER DYES

(54) Bezeichnung: LASER-KOMPATIBLE NIR-MARKER-FARBSTOFFE

(57) Abstract

The invention relates to so-called laser-compatible NIR-marker dyes on a polymethine basis for use in optical, notably fluorescing-optical, methods of determination and detection, for example in medicine, pharmacy and the biological, materials and environmental sciences. The aim of the invention is to provide NIR-marker dyes on a polymethine basis with high photo- and storage-stability as well as high fluorescence yield, in which fluorescence can be excited as simply as possibly by means of laser radiation in the visible or NIR spectral range, notably using light of an argon, helium/neon or diode laser. According to the invention dyes on the basis of polymethines of the general formula (I) are used.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenz-optischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren, beispielsweise in der Medizin, in der Pharmazie sowie in der Bio-, Material- und Umweltwissenschaft. Aufgabe war es, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im sichtbaren oder NIR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neon- oder Diodenlasers, zur Fluoreszenz angeregt werden können. Erfindungsgemäss werden Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen der allgemeinen Formel (I) eingesetzt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Ahmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	و∪
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugosławische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	1E	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	ΙT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

 $\hat{\chi}^{\hat{\zeta}}_{\hat{\zeta}}$

17.49

...

a c

24

1

5

10

15

20

25

30

Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe

Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren. Typische Verfahrensanwendungen beruhen auf der Reaktion von farbstoffmarkierten Antigenen, Antikörpern oder DNA-Segmenten mit der jeweils komplementären Spezies.

1

Einsa möglichkeiten ergeben sich beispielsweise in der Medizin und der Pharmazie, in der Bio- und Materialwissenschaft, bei der Umweltkontrolle und dem Nachweis von in Natur oder Technik vorkommenden organischen und anorganischen Mikroproben sowie anderes mehr.

Polymethine sind als NIR-Marker seit langem bekannt und zeichnen sich durch intensive, leicht in den NIR-Bereich verschiebbare Absorptionsmaxima aus (Fabian, J.; Nakazumi, H.; Matsuoka, M.: Chem.- Rev. 1992, 92, 1197). Bei geeignetem Substituentenmuster und π -Elektronensystem fluoreszieren sie mit ausreichender Quantenausbeute auch im NIR-Bereich. Entsprechend finden diese Verbindungen breite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Technik, als Sensibilisatoren in AqX-Materialien, als Laserfarbstoffe, als Quantenzahler, als Indikator-Farbstoffe in der Sensorik und nicht zuletzt als Biomarker ("Near-Infrared Dyes for High Technology Applications", herausgegeben von Daehne, S.; Resch-Genger, U.; Wolfbeis, O.-S., Kluwer, Academic Publishers - Dordrecht/Boston/ London - 1998). Die Anzahl der als Biomarker verwendeten Polymethine ist begrenzt. Breite kommerzielle Anwendung haben in diesem Sinne bisher nur das sich vom Astraphloxin (DE 415 534) abgeleitete Trimethin Cy3, bzw. das vinyloge Pentamethin Cy5 und das doppelt vinyloge Heptamethin Cy7 mit Absorptionsmaxima bei ca. 550 nm, ca. 650 nm und ca. 750 nm gefunden (US-PS 5 627 027). Darüber hinaus wird das polysulfonierte, vom kommerziellen Heptamethin "Indocyaningreen" bzw. "Cardio Green" abgeleitete Trimethin Cy3.5 und Pentamethin Cy5.5 angeboten (US-PS 5 569 766). In der Polymethinkette aliphatisch verbrückte Heptamethine wurden von Patonay entwickelt (US-

PS 5 800 995). Charakteristisch für alle kommerziellen Biomarker sind die sich vom

A STATE OF

11

3

7

10

15

20

25

30

Inden (Fischer-Base) bzw. Heteroinden ableitenden terminalen Heteroaromaten. Werden methylsubstituierte Cycloimonium-Salze dieses Typs als terminale Polymethin-Bausteine verwendet, so ist es notwendig, mindestens fünf aufeinander folgende sp²-hybridisierte Kohlenstoffatome (Pentamethine) zwischen den Heterocyclen anzuordnen um Absorptionsmaxima an der Grenze zum NIR-Bereich zu erzeugen.

Ein wesentlicher Nachteil der als Biomarker technisch genutzten NIR-Polymethine besteht darin, daß mit Verlängerung der Polymethinkette im steigenden Maße nucleopile bzw. elektrophile Angriffsmöglichkeiten auf die Kette gegeben sind, in deren Folge es zur Zerstörung des π -Systems kommt. Neben der ungenügenden thermischen und photochemischen Stabilität besteht ein weiterer wesentlicher Mangel der Polymethine darin, daß sie neben ihren intensiven Absorptionsmaxima keine weiteren Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich aufweisen und in diesem Spektrum, insbesondere durch Argon-Laser mit einer Emissonswellenlänge von $\lambda_{em} = 488$ nm oder He/Ne-Laser mit $\lambda_{em} = 633$ nm bzw. entsprechende Laserdioden ab λ_{em} = 670 nm, nicht unmittelbar angeregt werden können. Speziell die für "multiple color fluorescence assay's" geeigneten Biomarker können aber nur durch diskrete, vom π -System des Polymethins vorgegebene Lichtquellen (wie die vorgenannten) zur Anregung gebracht werden. Um dennoch derartige Anwendungen zu ermöglichen (bei der Nutzung von "multiple color fluorescence" assay's" ist es notwendig mit beispielsweise einer dieser Anregungslichtguellen verschiedene Biomarker mit deutlich unterschiedlichen Emissionmaxima anzuregen), erfolgt die Anregung von Cy5 durch einen Argon-Laser, indem beispielsweise mit Hilfe von Energietransfer über die Anregung von Fluorescein \rightarrow Rhodamin \rightarrow Texas Red \rightarrow Cy5 eine Emission über die Anregung von Licht an der Grenze zum NIR-Bereich bewirkt wird (US-PS 5 800 996). Weitere Möglichkeiten zur Anregung von Cy5, beispielsweise durch einen Argon-Laser bestehen darin, Mikropartikel aus intrinsischen Fluorophoren (Phycobiliproteinen) und dem extrinsischen Cy5 zu erzeugen, die über Energiekaskaden die Anregung des bei 650 nm absorbierenden Cy5-Derivates gestatten (Szöllösi, J.; Damjanovich, S.; Matyus, L.: Cytometry 1998, *34*, 159).

5

10

15

Von Gupta (US-PS 5 783 673) werden Farbstoff-Konjukate beschrieben, die durch die Reaktion von Phycobiliprotein mit aktivierten Fluorescein, Texas Red oder Cy5-Farbstoffen (Phycobiliprotein/Amine-Reactive Dye - PARD) dargestellt wurden. Diese so erhaltenen Farbstoff-Konjugate zeigen im sichtbaren Spektralbereich zusätzliche Absorptionsbanden, die zur Anregung genutzt werden können. Nachteilig an diesen Proben sind die hohe Molmasse, die aufwendige Präparation und die geringe Stabilität dieser Marker-Farbstoffe.

Ein weiteres Beispiel für die Anregung von an sich bei 488 nm nicht absorbierenden Pentamethinen gibt Glazer (US-PS 5 760 201). Durch die kovalente Verknüpfung mit einem im gewünschten Bereich absorbierenden Monomethin über mehrere ammoniumhaltige optimierte Alkylspacer wird zusätzlich eine starke Affinität zur DNA erreicht (spezifische Ionenbindung). Auch hier ist ein entsprechender Verfahrensaufwand zur Anregung unumgänglich. Weitere Nachteile dieser Marker-Farbstoffe bestehen in einer ungenügenden Photo- oder Lagerstabilität, in aufwendigen Synthese- und Reinigungsschritten, in geringen Absorptionskoeffizienten bzw. einer unbefriedigenden Fluoreszenzquantenausbeute sowie in unerwünschten Änderungen der optischen Eigenschaften in Gegenwart von Proteinen oder Nucleinsäureoligomeren bzw. nach Bindung an diese.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im Jichtbaren oder im nahen IR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neonoder Diodenlasers zur Fluoreszenz angeregt werden können.

25

Erfindungsgemäß werden Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen eingesetzt, die substituierte Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-, das 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo- 3*H*-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-, Chinaldin-sowie 9-Methylacridinderivate der allgemeinen Formeln la oder Ib oder Ic

4.

$$R^{4}$$
 R^{3}
 R^{2}
 R^{1}
 R^{1}

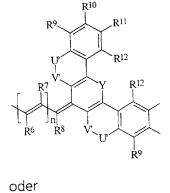
$$\begin{array}{c|c}
R^4 \\
R^3 \\
R^2 \\
R^1 \\
\mathbf{Ib}
\end{array}$$

$$\begin{array}{c|c}
R^2 & R^3 \\
R^5 & R^4 & \textbf{Ic}
\end{array}$$

enthalten mit Z als

$$\begin{array}{c}
R^{11} \\
R^{12} \\
R^{7} \\
R^{8}
\end{array}$$

$$R^{12}$$
 R^{11}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R^{12}
 R^{12}
 R^{11}
 R^{12}
 R



oder

oder

oder

5 wobei

10

- \times bzw. Y für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder $\mathrm{C(alkyl)_2}$ steht,
- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,
- R¹ R¹⁵ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy-

ú

治學等

33

....

30

oder Alkoxygruppe, eine alkylsubsituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei *ortho-*ständige Reste, z. B. R² und R³, zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,

- mindestens einer der Substituenten R¹ R¹⁵ einen ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻, oder NR₃⁺, darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt,
- mindestens einer der Substituenten R¹ R¹⁵ für eine reaktive Gruppe stehen
 kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht und
- U-V bzw. U'-V' gleich oder unterschiedlich sind und aus Wasserstoff, aus einer gesättigten aliphatischen, heteroaliphatischen oder aus einer Lacton- bzw.
 Thiolactongruppierung bestehen können.

In den Unteransprüchen 2-10 sind spezielle Ausführungsformen zu den Marker-Farbstoffen aufgeführt.

Diese substituierten Indol-, Heteroindol-, Pyridin-, Chinolin- oder Acridinderivate der allgemeinen Formel Ia oder Ib oder Ic können als Farbstoffe zur optischen Markierung von organischen oder anorganischen Mikropartikeln, z. B. von Proteinen, Nucleinsäuren, DNA, biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen polymerer Trägermaterialien verwendet werden.

Die Markierung der Partikel kann dabei durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Markern der allgemeinen Formeln la oder Ib oder Ic und dem zu markierenden Materialien erfolgen.

Die gegenüber Nucleophilen aktivierten funktionellen Gruppen dieser Marker vermögen kovalent an eine OH-, NH₂- oder SH-Funktion zu koppeln. Somit entsteht ein System zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von organischen und anorganischen Materialien, wie den besagten Proteinen, Nucleinsäuren, DNA,

biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen Polymeren.

Diese Kopplungsreaktion kann in wäßriger oder überwiegend wäßriger Lösung und vorzugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dabei entsteht ein Konjugat mit fluoreszenten Eigenschaften.

Sowohl die Verbindungen der allgemeinen Formeln la oder Ib oder Ic und davon abgeleitete Systeme können in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren zur Diagnostik von Zelleigenschaften, in Biosensoren (point of care-Messungen), Erforschung des Genoms und in Miniaturisierungstechnologien eingesetzt werden. Typische Anwendungen erfolgen in der Zytometrie und Zellsortierung, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), im Ultra-High-Troughput-Screening (UHTS), bei der multicolor Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und in Mikroarrays (Genchips).

15

20

10

-28

2

3.3

A. 1866.

1

Durch die Darstellung von nichtsymmetrischen Polymethinen, die einerseits als terminale Funktion einen leicht derivatisierbaren Heterocyclus vom Typ der Pyridin-, Chinolin-, Indol-, Heteroindol- bzw. Acridinderivate sowie andererseits einen neuartigen 6-Ringheterocyclus aufweisen, werden insbesondere nachfolgende Vorteile erreicht:

Bereits Trimethine absorbieren im Spektralbereich > 650 nm und zeigen eine gegenüber den bisher bekannten Polymethinen mit Absorptionsmaxima > 650 nm (Penta- und Hepta-methine) eine wesentlich verbesserte photochemische und thermische Stabilität.

Durch "molecular engineering" ist es möglich, Lage und Intensität der Absorptions-25 und Emissionsmaxima beliebig zu steuern und den Emissionswellenlängen unterschiedlicher Anregungslaser, vor allem NIR-Laserdioden, anzupassen.

Bedingt durch die Auswahl geeigneter terminaler Heterocyclen zeigen die erfindungsgemäßen Farbstoffe zusätzliche Absorptionsmaxima im sichtbaren bzw.

NIR-Spektralbereich, die zur Anregung, beispielsweise mit einem Argon-Laser 30

-

4

5

25

30

1.5

genutzt werden können. Diese Farbstoffe sind insbesondere zur Anwendung in "multiple color fluorescence assay's" geeignet.

Die Marker-Farbstoffe sind durch relativ einfache und in zwei Stufen durchzuführende Synthese herstellbar, mit welcher eine Vielzahl unterschiedlich funktionalisierter Farbstoffe, beispielsweise hinsichtlich der Gesamtladung des Farbstoffes und der Anzahl, Spezifität und Reaktivität der zur Immobilisierung genutzten aktivierten Gruppen, anwendungsspezifisch zur Verfügung gestellt werden kann.

- Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.
 - Es zeigen:
 - Fig. 1: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 1 und 2
 - Fig. 2: Synthese gemäß Ausführungsbeispiel 3
- 15 Fig. 3: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 4 bis 6
 - Fig. 4: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 7 und 8
 - Fig. 5: Absorptionsspektrum von C 1601
 - Fig. 6: Emissionsspektrum von C 1601 (frei, gebunden, 670 nm Diodenlaser)
 - Fig. 7: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 11 und 12
- 20 Fig. 8: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 13 und 14
 - Fig. 9: Absorptionsspektrum von C 1591 NHS-ester
 - Fig. 10: Emissionsspektrum von C 1591 (frei, gebunden, 670 nm Diodenlaser)
 - Fig. 11: Emissionsspektrum von C 1591 (frei, gebunden, 488 nm Ar-Ionenlaser)
 - Fig. 12: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 19 und 20

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 2-(2-Ethoxyethenyl)-7-diethylamino-benzo[b]pyrylium perchloraten C 1595 und L 107, vgl. Fig. 1:

0,01 mol von einem 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]pyrylium perchlorat der Formel 1a oder 1b werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 2,0 g Triethoxymethan kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und aus Eisessig umkristallisiert.

1:6-Diethylamino-4-ethoxymethylen-1.2.3.4-tetrahydro-<dibenzo[b;e]pyrylium> perchlorat C 1595: 3,58 g (87 %) Ausbeute, 178 °C Schmelzpunkt. -1H NMR $(CDCl_3)$: 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.78-1.82 (m, 2H), 2.54 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.59 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 4.53 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.93 (dd, J = 2.3, J = 9.3 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 8.52 (s, 1H). -13C NMR (CDCl₃): 12.5, 15.6, 20.2, 21.8, 27.8, 45.8, 73.1, 97.1, 108.3, 115.4, 115.8, 120.3, 130.6, 145.6, 154.8, 157.8, 163.0, 167.9. - C₂₀H₂₆CINO₆ (411.88): ber. C 58.32, H 6.36, Cl 8.61, N 3.40, gef. C 57.75, H 6.58, CI 8.43, N 3.46.

10

5

...

 $(x_{i,j}^{T_{i,j}})$

150

100

3

2: 3-Diethylamino-6-ethoxymethylen-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxoniacyclohepta[b]-naphthalen> perchlorat L 107: 3,96 g (93 %) Ausbeute, 158-60 °C -1H NMR (CDCl₃): 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.39 (t, J = 7.1 Hz, Schmelzpunkt. 3H), 1.75-1.77 (m, 2H), 1.85-1.87 (m, 2H), 2.58-2.61 (m, 2H), 2.79-2.83 (m, 2H), 3.58 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 4.56 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (dd, J = 2.4, J = 9.3 Hz, 1H), 15 J = 9.3 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.18 (s, 1H). -13C 7.16 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (d,NMR (CDCl₃): 12.5, 15.5, 21.1,23.8, 25.1, 29.2, 45.8, 72.4, 96.3, 113.2, 116.1, 116.3, 124.2, 130.8, 149.0, 155.0, 157.9, 162.8, 171.0. - C₂₁H₂₈CINO₆ (425.91): ber. C 59.22, H 6.63, Cl 8.32, N 3.29, gef. C 58.76, H 6.39, CI 8.75, N 3.34.

20

25

3: 3-Diethylamino-6-[3-(N-acetylanilino)-prop-2-yliden]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1590, vgl. Fig. 2: 2,13 g (0,005 mol) 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]pyrylium perchlorat der Formel 1b werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1,29 g (0,005 mol) (3-Anilinopropenyliden)-phenyl-ammoniumchlorid kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus Eisessig umkristallisiert: 2,00 g (74 %) Ausbeute, 216-20 °C Schmelzpunkt. -¹H NMR (CD₃NO₂): 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.64-1.69 (m, 2H), 1.82-1.87 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 2.49 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.72 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.61 (dd, J = 11.8 Hz, J = 13.5 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 2.430

Hz, J = 9.4 Hz, 1H), 7.36-7.39 (m, 2H), 7.54-7.65 (m, 4H), 8.21 (s, 1H), 8.27 (d, J

= 13.5 Hz, 1H). $-^{13}$ C NMR (CD₃NO₂): 12.8, 23.5, 25.2, 25.8, 25.9, 30.4, 47.2, 96.2, 109.9, 119.0, 119.3, 127.4, 129.9, 130.6, 130.7, 131.7, 132.0, 132.5, 140.1, 142.2, 151.3, 157.2, 160.1, 169.7, 171.2. $-C_{29}H_{33}CIN_2O_6$ (541.04): ber. C 64.38, H 6.15, CI 6.55, N 5.18, gef. C 63.73, H 6.15, CI 6.81, N 5.07.

5

樂

-74

. .

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 2-[6-(N-acetylanilino)-hexatrien-1.3.5-yliden]-benzo[b]pyrylium und thiopyrylium perchloraten C 1586, C 1573 und C 1574, vgl. Fig. 3:

0,005 mol von einem 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]-pyrylium perchlorat der Formel 1a, 1b oder ein 2-Methylen-4.6-diphenyl-thiopyrylium perchlorat der Formel 1c werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1,42 g (0,005 mol) (5-Anilinopenta-2.4-dienyliden)-phenyl-ammonium chlorid kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus Eisessig umkristallisiert.

15

20

4: 6-Diethylamino-4-[5-(N-Acetylanilino)-penta-2.4-dienyliden]-1.2.3.4.-tetrahydro-<dibenzo[b;e]pyrylium> perchlorat C 1586: 2,65 g (96 %) Ausbeute, 246-48 °C Schmelzpunkt. -¹H NMR (CD₃NO₂): 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.84-1.88 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 6 Hz, 2H), 3.72 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.38 (dd, J = 11.4 Hz, J = 13.8 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 11.9 Hz, J = 14.3 Hz, 1H), 7.00-7.08 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 3H), 7.56-7.62 (m, 3H), 7.71-7.75 (m, 2H), 8.00 (d, J = 13.8 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H). - C₃₀H₃₃ClN₂O₆ (553.05): ber. C 65.15, H 6.01, Cl 6.41, N 5.07, gef. C 63.57, H 6.08, Cl 5.14, N 4.92.

The state of the s

-0

17.0

5: 3-Diethylamino-6-[5-(N-acetylanilino)-penta-2.4-dienylidene]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1573: 2,61 g (92 %) Ausbeute, 202 °C Schmelzpunkt. -¹H NMR (CD₃NO₂): 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.78-1.82 (m, 2H), 1.90-1.94 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.76 (t, J = 6 Hz, 2H), 2.95 (t, J = 6 Hz, 2H), 3.75 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.39 (dd, J = 11.3 Hz, J = 13.9 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 11.9 Hz, J = 14.3 Hz, 1H), 6.98-7.06 (m, 2H), 7.32-7.36 (m, 3H), 7.52-7.63 (m, 4H), 7.77 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 13.8 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H). -¹³C NMR

 (CD_3NO_2) : 12.3, 22.9, 25.2, 25.5, 25.7, 30.2, 46.8, 95.7, 114.5, 118.7, 119.1, 126.0, 127.7, 129.7, 130.1, 131.1, 131.5, 132.1, 137.8, 140.1, 142.1, 144.4, 150.8, 156.9, 159.8, 169.3, 170.3. - $C_{31}H_{35}CIN_2O_6$ (567.08): ber. C 65.66, H 6.22, CI 6.25, N 4.94, gef. C 64.42, H 6.27, CI 6.13, N 4.78.

5

¥.

N. S.

6: 8-[5-(N-Acetylanilino)-penta-2.4-dienylidene]-2.4-diphenyl-5.6.7.8-tetrahydro-
>benzo[b]thiopyrylium>perchlorat C 1574: 2,37 g (79 %) Ausbeute, 216-18 °C Schmelzpunkt. - $C_{34}H_{30}CINO_5S$ (600.13): ber. C 68.05, H 5.04, Cl 5.91, N 2.33, S 5.34, gef. C 67.34, H 5.03, Cl 5.67, N 2.24, S 5.18.

10

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 7-Diethylamino-2-[3-(1-alkyl-3.3-dimetyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-propen-1-yl]-benzo[b]pyrylium perchloraten C 1592 und C 1601, vgl. Fig. 4:

In einer ersten Variante werden 0,005 mol von einem Indolderivat 2a bzw. 2b (Mujumdar, R. T.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: Bioconjugate Chem. 1993, 4, 105) zusammen mit 2,13 g (0,005 mol) L 107 in 30 ml Acetanhydrid und 10 Tropfen Piperidin für ca. zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohprodukt mit Ethylether gefällt und durch Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol/Aceton 1 : 1) gereinigt.

- In einer zweiten Variante kommen (wie in Fig. 4 angedeutet) anstelle von L 107 2,13 g (0,005 mol) von einem Perchlorat 3b (*Kanitz, A.; Hartmann, H.; Czerney, P.: J. Prakt. Chem.* 1998, *340*, 34) zur Anwendung. Dabei ist es notwendig, die Reaktionszeit um ca. zehn Minuten zu erhöhen.
- 7: 3-Diethylamino-6-[2-(1-n-butyl-3.3-dimethyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-ethylidenl]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1592: 1,87 g (63 %) Ausbeute/Variante A, 1,34 g (45 %) Ausbeute/Variante B, 216-18 °C Schmelzpunkt. HRMS-FAB ($C_{34}H_{43}N_2O$): ber. 495.337539; gef. 495.335970; D = 1.569 mmU.

8: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(4-sulfonatobutyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen>kali-um \subset 1601: 1,25 g (36 %) Ausbeute, 216-18 °C Schmelzpunkt - HRMS-FAB ($C_{34}H_{42}KN_2O_7S_2$): ber. 693.207053; gef. 693.203060; D = 3.99 mmU.

9: Absorptionsspektren von C 1601: Fig. 5 zeigt das Absorptionsspektrum von C 1601 in reinem PBS (Phosphate Buffer Saline) und nach der Zugabe von Albumin aus Humanserun (HSA).

10

5

.

-37

4

*

6

S. 1. 3.

3.2

10: Fluoreszenzspekten von C 1601: Fig. 6 zeigt die Emissionsspektren von C 1601 (angeregt durch einen 670 nm Diodenlaser) in reinem PBS und nach der Zugabe von HSA. Die Intensität der Fluoreszenz hat sich nach der Zugabe von HSA um den Faktor fünf verstärkt.

15

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 7-Diethylamino-2-[3-(1-(5-carboxypentyl-3.3-dimetyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-propen-1-yl]-benzo[b]-pyrylium perchloraten C 1602 und C 1591, vgl. Fig. 7:

1,77 g (0,005 mol) von einem Indolderivat 2c (Mujumdar, R. T.; Ernst, L. A.;
20 Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 105) und 0,005 mol C 1595 bzw. L 107 werden in 40 ml einer Mischung aus Pyridin/Acetanhydrid (1/1) für ca. zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohprodukt mit Ethylether gefällt und durch Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol) gereinigt.

25

11: 6-Diethylamino-4-<2-[1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-1.2.3.4-tetrahydro-<dibenzo[b;e]pyrylium> betain C 1602:

2,20 g (71 %) Ausbeute, >310 °C Schmelzpunkt. - $C_{35}H_{44}KN_2O_7S$ (657.89 * H_2O): ber. C 62.20, H 6.56, N 4.14, S 4.74, gef. C 61.74, H 6.53, N 4.06, S 4.26. - HRMS-FAB ($C_{35}H_{43}N_2O_6S$): ber. 619.284184; gef. 619.286390; D = -2.205 mmU. 12: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> betain C 1591: 2,15 g (68 %) Ausbeute, >340 °C Schmelzpunkt. - $C_{36}H_{46}KN_2O_7S$ (671.91 * H_2O): ber. C 62.68, H 6.73, N 4.06, S 4.64, gef. C 62.37, H 6.61, N 4.07, S 4.34. - HRMS-FAB ($C_{36}H_{45}N_2O_6S$): ber. 633.299834; gef. 633.308710; D = -8.875 mmU.

All memeine Vorschrift zur Darstellung von NHS-ester mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)/N.N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), vgl. Fig. 8:

15 mg C 1602 bzw. C 1591, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden in 1 ml trockenem DMF gelöst und mit 10 μl Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Ether gewaschen und am Ölpumpenvakuum getrocknet.

15

25

. . . .

4

支援

貔

- 13: *C 1602-NHS-ester*: Die Reaktion verläuft quantitativ.
- 14: *C 1591-NHS-ester*: Die Reaktion verläuft quantitativ.
- 20 15: Kovalente Markierung von Albumin aus Humanserum (HSA) mit C 1591-NHS-ester:

C 1591-NHS-ester (ca. 0,5 mg) werden in 50 μ l DMF und 5 mg HSA in 750 μ l Bicarbonatpuffer (0.1 mol/l, pH = 9.0) gelöst. Beide Lösungen werden langsam vereint und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das markierte HSA durch Gelchromatographie vom nicht gebundenen Farbstoff getrennt. Als stationäre Phase dient Sephadex G50, als Laufmittel Phosphatpuffer (22 mmol/l, pH 7.2).

16: Absorptionsspektren von C 1591-Derivaten: Fig. 9 zeigt das 30 Absorptionsspektrum von einem aktivierten C 1591-NHS-ester und C 1591 kovalent gebunden an HSA. Als Lösungsmittel wurde für beide Messungen PBS (Phosphate Buffer Saline) verwendet.

17: Fluoreszenzspektren von C 1591-Derivaten: Fig. 10 zeigt das
 5 Emissionsspektrum von einem aktivierten C 1591-NHS-ester und C 1591 kovalent gebunden ans HSA.

Zur Anregung wurde ein 670 nm Diodenlaser (*Spindler & Hoyer*, Leistung max. 3 mW) verwendet. Als Lösungsmittel für beide Messungen diente PBS.

10 18: Fluoreszenzspektren von C 1591-Derivaten: Fig. 11 zeigt das Emissionsspektrum von einem aktivierten C 1591-NHS-ester und C 1591 kovalent gebunden an HSA.

Zur Anregung wurde ein 488 nm Ar-Ionenlaser (*Ion Laser Technology*, Leistung max. 100 mW) verwendet. Als Lösungsmittel für beide Messungen diente PBS.

15

孌

凝

- 19: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(3-acetoxypropyl)-3.3-dimethyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1594, vgl. Fig. 12:
- 1,94 g (2,005 mol) 1-(1-Acetoxypropyl)-2.3.3-trimethyl-3*H*-indolinium iodid 2d (*Brush et al.* ,US-PS 5 808 044) und 2,13 g (0,005 mol) L 107 werden in einer Mischung aus jeweils 20 ml Pyridin und 20 ml Acetanhydrid ca. 20 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die noch acetylierte Zwischenstufe mit Ether gefällt und im Vakuum getrocknet. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch präparative Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol). 0,87 g (29 %) Ausbeute,
- 25 155-62 °C Schmelzpunkt. HRMS-FAB ($C_{35}H_{43}N_2O_3$): ber. 539.327368; gef. 539.328510; D = -1.142 mmU.
 - 20: Darstellung vom C 1594-phosphoramidit, vgl. Fig. 12:
- Zur Hydrolyse werden 200 mg C 1594 in 10 ml Methanol gelöst und unter Zugabe von 50 mg Natriumcarbonat zwei Stunden gerührt. Im Anschluß daran wird filtriert sowie der entacylierte Farbstoff durch Zugabe von Ether ausgefällt und getrocknet.

 $D_{ij}^{(i)}$

*

Das erhaltene Produkt wird in trockenem DMF gelöst und mit 0.15 ml N.N- Diisopropylamin versetzt. Zu dieser Lösung gibt man im Verlauf einer Stunde dreimal je 40 μ l 2-Cyanoethyl-N.N-Diisopropylchlorophosphoramidit. Dabei wird der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach quantitativem Ablauf der Reaktion das Produkt direkt zum Markieren von DNA eingesetzt.

Patentansprüche

1. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen, enthaltend substituierte Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-, das 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo- 3*H*-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-, Chinaldin- sowie 9-Methylacridinderivate der allgemeinen Formeln la oder lb oder lc

$$R^4$$
 R^5
 R^3
 R^2
 R^1
 R^5
 R^5
 R^5
 R^4
 R^3
 R^3
 R^2
 R^1
 R^3

$$\mathbb{R}^3$$
 \mathbb{R}^4
 \mathbb{R}^5
 \mathbb{R}^2
 \mathbb{R}^1
 \mathbb{R}^5

10 mit Z als

5

$$\begin{array}{c|c}
R^{10} \\
R^{12} \\
R^{7} \\
R^{7} \\
R^{8}
\end{array}$$

R14

R12

oder

R15

24

198

$$\begin{array}{c|c}
R^{12} & & F \\
R^7 & Y & & F \\
R^8 & U & V & & F
\end{array}$$

oder

oder

oder

wobei

- X bzw. Y für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ steht,
- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,

5

10

The best of the second of the

17.

.

- R¹ R¹⁵ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy- oder Alkoxygruppe, eine alkylsubsituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei ortho-ständige Reste, z. B. R² und R³, zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,
- mindestens einer der Substituenten R¹ R¹⁵ einen ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻, oder NR₃⁺, darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt,

- mindestens einer der Substituenten R¹ R¹⁵ für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht und
- 20 U-V bzw. U'-V' gleich oder unterschiedlich sind und aus Wasserstoff, aus einer gesättigten aliphatischen, heteroaliphatischen oder aus einer Lacton- bzw. Thiolactongruppierung bestehen können.
- Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Gruppe aus folgenden Funktionalitäten ausgewählt ist: Isothiocyanate, Isocyanate, Monochlortriazine, Dichlortriazine, Aziridine, Sulfonylhalogenide, N-Hydroxysuccinimidester, Imido-Ester, Glyoxal oder Aldehyd für Amin- und Hydroxy-Funktionen bzw. Maleimide oder Iodacetamide für Thiol-Funktionen sowie Phosphoramidite für die Markierung der DNA oder RNA oder deren Bruchstücke.

3. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Gruppe über Spacer-Gruppen der allgemeinen Struktur $-(CH_2)_{m^-}$ am eigentlichen Chromophor gebunden ist, wobei m Werte von 1 bis 18 annehmen kann.

5

10

Notes to the part of the steam of the steam

46

建

digital

- 4. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit =CR⁷- auch eine Verbrückung über vierfünf- und sechsgliedrige Ringsysteme beinhaltet, wobei sich an dieser auch reaktive Gruppen befinden und die Substituenten A G die gleiche Funktionalität wie die Substituenten R¹ R¹⁵ besitzen können.
- 5. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit =CR 7 (n = 2) für

$$\bigwedge_{\mathsf{A}_{\Theta}}^{\mathsf{B}}$$

steht.

15

6. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit =CR⁷- (n = 2) für

$$C$$
 A_{Θ}

steht.

.....

7. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit =CR 7 - (n = 3) für

steht.

5 8. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit =CR 7 - (n = 3) für

$$E \xrightarrow{F} G$$

10

steht.

- 9. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Substituenten A C für O, S, C(CN)₂ bzw. N-R stehen, wobei R in N-R für einen aliphatischen oder aromatischen bzw. einem reaktiven aliphatischen oder aromatischen Rest, wie (CH₂)_nCOOH oder (CH₂)_nNH₂, stehen kann.
- 10. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Substituent D für CI oder ein aromatisches bzw. aliphatisches Ringsystem steht, an dem gegebenenfalls reaktive Substituenten entsprechend den R¹ bis R¹⁵ angebracht sind.

Fig. 1

1b +
$$Ac_2O$$
 ClO_4
 ClO_4
 ClO_4
 ClO_4
 ClO_4

Fig. 2

STATE OF

200

额装

1a +
$$Ac_2O$$

C 1586

C 1586

C 1574

C 1574

C 1574

C 1574

W. 182

44

Fig. 4

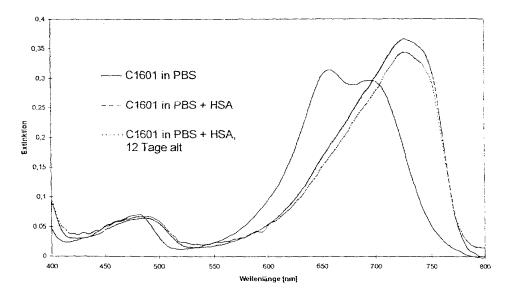


Fig. 5

₩ × · · · **₩**

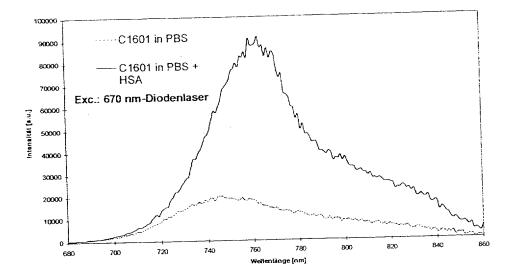


Fig. 6

$$+ C 1595 \xrightarrow{AC_2O} {}^{\Theta}O_3S \xrightarrow{} C 1602$$

$$+ L 107 \xrightarrow{}^{AC_2O} O_3S \xrightarrow{} C 1591$$
Fig. 7

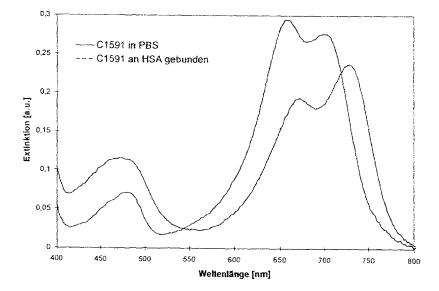


Fig. 9

**

, 2, 3

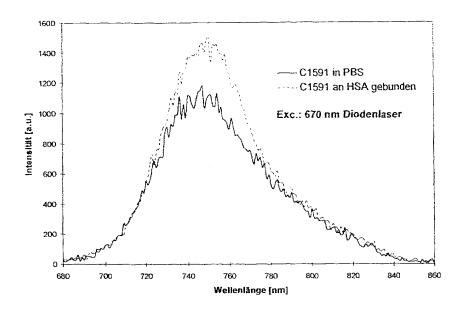


Fig. 10

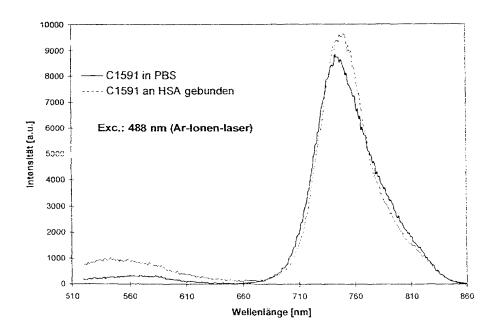


Fig. 11

*

INTERNA NAL SEARCH REPORT

Inter inal Application No

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER I P C 7 C09B23/02 C09B23/10 G01N33/58 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) I P C 7 C09B G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the	fields searched
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C09B G01N	fields searched
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C09B G01N	fields searched
IPC 7 C09B G01N	fields searched
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the	fields searched
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search tem EPO-Internal, WPI Data, PAJ	ns used)
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A WO 96 13552 A (MOLECULAR PROBES INC) 9 May 1996 (1996-05-09) claims 1-21; examples 1-18; tables 3-5	1-10
A WO 94 24213 A (MOLECULAR PROBES INC) 27 October 1994 (1994-10-27) claims 1-14	1-10
A US 5 760 201 A (GLAZER ET AL) 2 June 1998 (1998-06-02) cited in the application claims; figures 2,5,6; examples	1-10
A WO 96 41144 A (HYPERION INC) 19 December 1996 (1996-12-19) page 9, line 21 -page 13, line 31; claims; figures 70,7R,7U,7V	1-10
-/	
Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members an	re listed in annex.
which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "Y" document of particular relevance cannot be considered to involve document is combined with or ments, such combination being in the art. "X" document member of the same	flict with the application but pole or theory underlying the ce; the claimed invention or cannot be considered to in the document is taken alone ce; the claimed invention we an inventive step when the ne or more other such docu- ng obvious to a person skilled
Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search	ional search report
30 June 2000 12/07/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 Ginoux, C	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

inter Inal Application No PCT/DE 00/00802

212	A COMMITTED CONTRIBUTE TO DE CONTRIBUTE	<u> </u>	
	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
Category °	Ortagori or document, with mulcation, where appropriate, or the relevant passages		Hosvant to claim NO.
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15 March 1990 (1990-03-15) page 9, line 22 -page 12, line 48; claims 1,42-49		1-10
A	HIROYUKI NAKAZUMI AND MASARU MATSUOKA: "Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS.US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 cited in the application page 1207, left-hand column, paragraph 3 -page 1210, right-hand column, paragraph 1		1-10

5

INTERN ONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. nal Application No PCT/DE 00/00802

Patent document cited in search report		Publication date		atent family member(s)	Publication date
WO 9613552	A	09-05-1996	US AU AU EP JP US	5658751 A 714890 B 3967295 A 0740689 A 9507879 T 5863753 A	19-08-1997 13-01-2000 23-05-1996 06-11-1996 12-08-1997 26-01-1999
WO 9424213	A	27-10-1994	AU CA EP US US US US	676317 B 6634594 A 2133765 A 0675924 A 5436134 A 5545535 A 5534416 A 5445946 A 5658751 A	06-03-1997 08-11-1994 27-10-1994 11-10-1995 25-07-1995 13-08-1996 09-07-1996 29-08-1995 19-08-1997
US 5760201	Α	02-06-1998	US US WO	5565554 A 5929227 A 9604405 A	15-10-1996 27-07-1999 15-02-1996
WO 9641144	A	19-12-1996	US CA CN US US	5880287 A 2223418 A 1198816 A 5919922 A 6060598 A	09-03-1999 19-12-1996 11-11-1998 06-07-1999 09-05-2000
DE 3912046	A	15-03-1990	JP JP JP JP US US US	2191674 A 2757965 B 10096727 A 2898264 B 10088012 A 5486616 A 5569766 A 5569587 A 5268486 A	27-07-1990 25-05-1998 14-04-1998 31-05-1999 07-04-1998 23-01-1996 29-10-1996 29-10-1996 07-12-1993

79

No.

INTERNATIONALER

CHERCHENBERICHT

nales Aktenzeichen PCT/DE 00/00802 a. Klassifizierung des anmeldungsgegenstandes IPK 7 C09B23/02 C09B23/10 G01N33/58 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprufstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C09B G01N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank, und evtl. verwendete Suchbediffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. Kategorie® Α WO 96 13552 A (MOLECULAR PROBES INC) 1-10 9. Mai 1996 (1996-05-09) Ansprüche 1-21; Beispiele 1-18; Tabellen WO 94 24213 A (MOLECULAR PROBES INC) 1-10 Α 27. Oktober 1994 (1994-10-27) Ansprüche 1-14 US 5 760 201 A (GLAZER ET AL) 1-10 A 2. Juni 1998 (1998-06-02) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche; Abbildungen 2,5,6; Beispiele WO 96 41144 A (HYPERION INC) Α 1-10 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Seite 9, Zeile 21 -Seite 13, Zeile 31; Ansprüche; Abbildungen 70,7R,7U,7V χ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen Spätere Veröffentlichung, die nach dem "ternationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Ammeldung nicht kollidiert, sondem nur zum Verständnis des der "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder inach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden "Y kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit berühend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) ausgerunn;
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeidedatum, aber nach "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenhenchts 30. Juni 2000 12/07/2000

NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

1

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

Bevollmächtigter Bediensteter

Ginoux, C

INTERNATIONALER

CHERCHENBERICHT

PCT/DE 00/00802

ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15. März 1990 (1990-03-15) Seite 9, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 48; Ansprüche 1,42-49 HIROYUKI NAKAZUMI AND MASARU MATSUOKA: "Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1. Januar 1992 (1992-01-01), Seiten 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 in der Anmeldung erwähnt Seite 1207, linke Spalte, Absatz 3 -Seite 1210, rechte Spalte, Absatz 1	e Betr. Anspruch Nr. 1-10 1-10
DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15. März 1990 (1990-03-15) Seite 9, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 48; Ansprüche 1,42-49 HIROYUKI NAKAZUMI AND MASARU MATSUOKA: "Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1. Januar 1992 (1992-01-01), Seiten 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 in der Anmeldung erwähnt Seite 1207, linke Spalte, Absatz 3 -Seite	1-10
15. März 1990 (1990-03-15) Seite 9, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 48; Ansprüche 1,42-49 HIROYUKI NAKAZUMI AND MASARU MATSUOKA: "Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1. Januar 1992 (1992-01-01), Seiten 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 in der Anmeldung erwähnt Seite 1207, linke Spalte, Absatz 3 -Seite	
"Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1. Januar 1992 (1992-01-01), Seiten 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 in der Anmeldung erwähnt Seite 1207, linke Spalte, Absatz 3 -Seite	1-10

1

INTERNATIONALER -

CHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern nales Aktenzeichen PCT/DE 00/00802

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO	9613552	А	09-05-1996	US AU	5658751 A 714890 B	19-08-1997 13-01-2000
				AU	3967295 A	23-05-1996
				EP	0740689 A	06-11-1996
				JP	9507879 T	12-08-1997
				US	5863753 A	26-01-1999
WO	9424213	Α	27-10-1994	AU	676317 B	06-03-1997
				AU	6634594 A	08-11-1994
				CA	2133765 A	27-10-1994
				EP	0675924 A	11-10-1995
				US	5436134 A	25-07-1995
				US	5545535 A	13-08-1996
				US	5534416 A	09-07-1996
				US	5445946 A	29-08-1995
				US	5658751 A	19-08-1997
US	5760201	Α	02-06-1998	US	5565554 A	15-10-1996
				US	5929227 A	27-07-1999
				WO	9604405 A	15-02-1996
WO	9641144	А	19-12-1996	US	5880287 A	09-03-1999
				CA	2223418 A	19-12-1996
				CN	1198816 A	11-11-1998
				US	5919922 A	06-07-1999
				US 	6060598 A	09-05-2000
DE	3912046	Α	15-03-1990	JP	2191674 A	27-07-1990
				JP	2757965 B	25-05-1998
				JP	10096727 A	14-04-1998
				JP	2898264 B	31-05-1999
				JP	10088012 A	07-04-1998
				US	5486616 A	23-01-1996
				US	5569766 A	29-10-1996
				US	5569587 A	29-10-1996
				US	5268 4 86 A	07-12-1993

....